UNIVERSITE DE LAUSANNE FACULTE DE MEDECINE
Service de Gynécologie-Obstétrique
Directeur: Professeur W. R. Merz

Ocytocinase

Etude de la fiabilité d'une méthode de dosage et des valeurs de l'enzyme au cours de la grossesse normale

THESE

préparée dans le Service de Gynécologie-Obstétrique
du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois,
Lausanne, Suisse,
sous la direction du Professeur H. Bossart

et

présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Lausanne
pour l'obtention du grade de
docteur en médecine

par
JEAN-MARC LAMBERCY
Médecin diplômé de l'Université de Lausanne
Originaire de Valeyres/Rances (Suisse)

Lausanne
1977

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546809_0058

UNIVERSITE DE LAUSANNE FACULTE DE MEDECINE
Service de Gynécologie-Obstétrique
Directeur: Professeur W. R. Merz

Ocytocinase

Etude de la fiabilité d'une méthode de dosage et des valeurs de l'enzyme au cours de la grossesse normale

THESE

préparée dans le Service de Gynécologie-Obstétrique
du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois,
Lausanne, Suisse,
sous la direction du Professeur H. Bossart

et

présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Lausanne
pour l'obtention du grade de
docteur en médecine

par

JEAN-MARC LAMBERCY
Médecin diplômé de l'Université de Lausanne
Originaire de Valeyres/Rances (Suisse)

Université de Lausanne

Faculté de Médecine

Le Conseil de la faculté de médecine de l'Université de Lausanne, après avoir pris connaissance des rapports favorables de M. le professeur

H. BOSSART et Dr J. MAUEL prof. assistant,

et sans se prononcer sur les opinions du candidat, autorise l'impression de la thèse intitulée:

"OCYTOCINASE"

ETUDE DE LA FIABILITE D'UNE METHODE DE DOSAGE ET DES VALEURS DE L'ENZYME AU COURS DE LA GROSSESSE NORMALE,

présentée par Monsieur Jean-Marc LAMBERCY,

Médecin diplômé de l'Université de Lausanne,

pour l'obtention du grade de Docteur en médecine.

Lausanne, le 23 août *19* 77

Le Doyen:

Prof. G. FAVEZ

UNIV. LEIDEN BIBL.

Au Professeur H. Bossart qui a bien voulu accepter la direction de cette thèse, en témoignage de mon profond respect.

Au Professeur W.R. Merz, chef du service de gynécologie-obstétrique du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, responsable de ma formation, en témoignage de mon profond respect.

Au Dr H. Kleiner pour sa collaboration fructueuse dans l'élaboration de cette thèse.

Je remercie l'équipe des soins intensifs du département d'obstétrique du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois - Melles Reymondin, Dobler, Ruegg et Matthey - de sa précieuse collaboration.

Je remercie Mme Dellenbach pour son aide dans mes recherches bibliographiques.

Finalement, je remercie Melle E. Ernst, indispensable à la dactylographie de ce travail.

A mon père - A ma femme

TABLE DES MATIERES

I.	Introduction	6
II.	Ocytocine	7
III.	Cystine-Aminopeptidase (ocytocinase)	10
IV.	Méthodes de dosage (historique)	15
V.	Méthode de dosage	23
VI.	Contrôle de précision	25
VII.	Ocytocinase : valeurs au cours de la grossesse normale	39
VIII.	Conclusions	46
IX.	Résumé	47
X.	Bibliographie	48

I. INTRODUCTION

L'obstétricien tend à garantir l'intégrité corporelle et plus particulièrement cérébrale du foetus, cela bien sûr sans pour autant négliger la santé maternelle.

Dans cette optique, on a vu se développer de nombreuses méthodes de surveillance de la grossesse, en particulier de nouveaux dosages hormonaux et enzymatiques, l'examen de ces différents paramètres permettant à l'obstétricien de se faire une idée plus précise de l'état de l'unité foeto-placentaire.

Le but de ce travail est l'étude des valeurs de la cystine-aminopeptidase ou ocytocinase au cours d'une grossesse normale, en ayant préalablement procédé à un contrôle de précision de la méthode de dosage choisie. Cette substance, suspectée il y a près de 40 ans (26), a vu sa nature enzymatique démontrée en 1941 (92,93).

II. OCYTOCINE

Lorsque l'on prépare une étude sur un enzyme, il est difficile de séparer l'étude du dit enzyme de son substrat biologique normal; dans le cas présent, nous voulons parler de l'ocytocine.

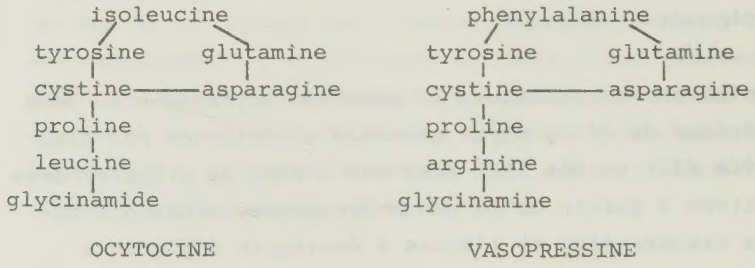
Déjà à la fin du siècle dernier, Olivier et Schäfer (22) montrent que des extraits complets de l'hypophyse ont des effets vasopresseurs. Howell en 1898 met en évidence le fait que cette action provient du lobe postérieur de l'hypophyse (22) et, en 1906, Howell et Dale démontrent une augmentation de l'activité utérine sous l'effet d'extraits hypophysaires (22).

Du point de vue chimique, le principe ocytocique du lobe postérieur de l'hypophyse sera mis en évidence par Abel en 1928 (22) et dès 1928 Kamm est à même de préparer deux fractions à partir de la neuro-hypophyse, l'une à dominante vasopressive et l'autre à dominante ocytocique (1,22).

La purification de la substance est à mettre à l'actif de Du Vigneaud (24) qui, dans les années 1953 - 1955 mettait au point une technique de distribution à contrecourant, permettant d'isoler l'ocytocine et la vasopressine à partir de fractions préparées selon la méthode de Kamm de 1928. Par la suite, d'autres méthodes ont été développées basées sur l'électrophorèse (Porath, 1957) et la chromatographie (Condliffe, 1955; Acher, Light et Du Vigneaud, 1958; Schaller, Libscomb et Guillemin, 1959) (24).

La séquence des acides aminés de cet octapeptide d'un poids moléculaire de 1007 a été mise en évidence simultanément par deux auteurs (24,79) travaillant à partir de l'ocytocine de boeuf :
On procède dans un premier temps à une hydrolyse partielle qui sépare l'octapeptide en plusieurs fragments; puis, oxydation par l'acide performique pour casser le pont disulfure de la cystine, enfin, le produit est exposé à l'action de l'acide chlorhydrique 12N, ceci pour plusieurs jours. L'hydrolysat est ensuite fractionné par électrodialyse et les fragments de chaque fraction purifiés par chromatographie sur papier.

Tableau 1 : Ocytocine et Vasopressine.



Légende : Représentation schématique des 2 chaînes d'acides aminés formant les 2 octapeptides.

L'ocytocine, tout comme la vasopressine d'ailleurs, est formée dans les noyaux supra-optiques du diencéphale et de là gagne l'hypophyse où elle est stockée au niveau du lobe postérieur (84).

Le terme d'ocytocine doit être réservé à l'hormone de mammifère provoquant la contraction utérine. Au début, rien n'indiquait des différences de structure entre les ocytocines mises en évidence chez les différents mammifères. Toutefois, d'autres substances "ocytociques" ont été découvertes chez des vertébrés inférieurs, mais sont différentes chimiquement (1).

Le rôle exact de l'ocytocine lors de l'accouchement reste incertain (15,75). L'estimation directe de l'ocytocine en circulation maternelle a donné des résultats contradictoires (4,13,14,19,21,28,30,32,33,34,43,52,53,88); par ailleurs, l'hypophyse foetale représente aussi une source d'ocytocine (14,53,69).

De récentes études semblent montrer, cependant, qu'au cours de l'accouchement l'hormone est relâchée dans la circulation maternelle par pics successifs qui augmentent de fréquence avec la progression du travail (33).

III. CYSTINE AMINOPEPTIDASE "OCYTOCINASE"

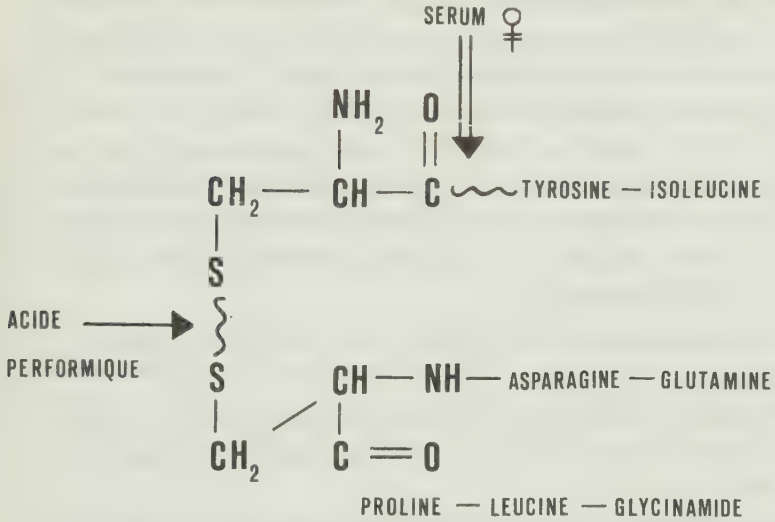
Après ce bref historique de l'ocytocine, si l'on se penche sur "l'histoire" de l'ocytocinase, la première date importante se situe en 1930 (26), époque à laquelle Fekete met en évidence l'action destructive du sérum de femme enceinte sur des substrats à dominance ocytocique.

Deux ans plus tard, le même auteur (27) démontre que l'effet ocytocique est diminué quand les extraits de la neurohypophyse sont testés sur du sérum de femme enceinte. La nature enzymatique de cette réaction devait être mise en évidence en 1941 (92,93).

En 1957, deux auteurs (80) démontrent le mécanisme d'action du sérum de la femme enceinte sur l'ocytocine. Ces auteurs observent qu'en faisant agir de l'acide performique sur l'ocytocine, le pont disulfure est oxydé et qu'il en résulte un produit simple inactif. Si par contre, l'ocytocine est inactivée par le sérum de femme enceinte avant l'addition d'acide performique, on retrouve par analyse chromatographique une quantité considérable d'acide cystéinique en plus d'une chaîne polypeptidique ouverte.

D'où la conclusion que l'ocytocinase est une aminopeptidase cystinique agissant sur le pont peptidique reliant la cystine et la thyrosine.

Tableau no 2 : Ocytocine : Sites d'action du sérum de femme enceinte et de l'acide performique.



Légende : Ce tableau, représentation chimique de l'ocytocine, résume les travaux de Tuppy et Nesvadba (80) sur les sites d'action du sérum de femme enceinte et de l'acide performique.

Les études sur cet enzyme se poursuivent dès lors, études qui portent sur deux plans particuliers : tout d'abord sur la purification de l'enzyme, puis sur son origine.

Si l'on s'attache premièrement au problème de la purification, celle-ci sera réalisée de la meilleure façon par Tuppy et Wintersberger à partir de matériel sérique rétroplacentaire (81).

Cette purification va mettre en évidence le fait que l'aminopeptidase de grossesse agit de façon préférentielle sur les composants présentant un résidu demi-cystinique en position terminale.

Cet enzyme rentre dans la catégorie des protéases, mais il n'appartient ni au groupe dont l'activité dépend de la présence d'un ou de plusieurs groupes thiols, ni au groupe dont l'activité depend de la présence d'ions métalliques dissociables. Il semble plutôt appartenir à un autre groupe qui est inhibé par les organophosporés. Les mêmes auteurs (94), ainsi que des chercheurs américains (58) se sont appliqués à investiguer la distribution électrophorétique du gel d'amidon de l'activité aminopeptidasique du sérum de femme enceinte. Par cette méthode, on peut distinguer trois composés :

a) 1 composé migrant rapidement, la leucine-aminopeptidase (LAP)
b) 1 second composé migrant plus lentement entre les globulines alpha et béta, la cystine aminopeptidase$_1$ (CAP$_1$)
c) et finalement, un troisième composé qui migre derrière les bétaglobulines, la cystine aminopeptidase$_2$ (CAP$_2$).

Le premier composé, la leucine aminopeptidase, se retrouve dans le plasma d'homme et de femme non enceinte. Par contre, les deux autres composés se retrouvent, selon ces deux auteurs, dans le plasma de la femme enceinte uniquement.

Cependant, Tuppy (communication personnelle faite à Melander) (54) a été capable de mettre en évidence une activité de type cystine aminopeptidase$_1$ dans le plasma de femme non enceinte.

L'activité enzymatique de ces différents composés a été analysée par Wintersberger (94) qui arrive à la conclusion que le composé cystine aminopeptidase$_2$ représente "l'ocytocinase".

En effet, quand un mélange de sérum de femme non enceinte et une préparation hautement purifiée de la cystine aminopeptidase sont analysés par électrophorèse sur gel d'amidon, on retrouve deux bandes correspondant exactement à celles de la LAP et de la CAP_2 que l'on trouve lors d'une analyse électrophorétique de sérum de femme enceinte.

Par ailleurs, analysée seule, la préparation de l'enzyme purifié migre sur gel d'amidon exactement à l'endroit de la CAP_2 du sérum de femme enceinte.

Toutefois, dans le sérum de patients atteints d'affections hépatiques ou de cancer avancé, il est parfois possible de mettre en évidence par électrophorèse en plus d'une bande LAP des bandes CAP_1 et CAP_2.

En procédant à des analyses électrophorétiques sur gel d'acrylamyde, ce qui permet une répartition électrophorétique plus précise, d'autres auteurs (46,49) ont confirmé ces différentes expériences. La CAP_1 migre comme une alpha-2-globuline rapide et la CAP_2 comme une alpha-2-globuline lente.

Cette aminopeptidase possède un poids moléculaire d'environ 300'000 et elle n'est pas, de ce fait, excrétée dans les urines (96). La demi-vie de l'enzyme est selon Ryden (64) de 3 à 6 jours et selon Christensen (16) de 8,3 jours.

Bien que ces deux auteurs aient travaillé sur des collectifs restreints, il faut retenir de leurs études la durée relativement importante de la demi-vie de cet enzyme.

Pour ce qui est de l'origine de la cystine aminopeptidase, déjà en 1946 (57) est émise l'hypothèse d'une source dans les cellules syncitiales du trophoblaste. D'autres travaux iront, ultérieurement, dans le même sens (66,80).

En 1961, Page (58) va confirmer son hypothèse par des analyses électrophorétiques. Dès lors, l'origine placentaire de cet enzyme ne sera plus formellement contestée. Cependant, en 1962, Riad (61) émettra quelques réserves quant à l'origine seulement placentaire de l'enzyme :

- Le taux enzymatique que l'on trouve dans les vaisseaux utérins n'est pas supérieur à celui mis en évidence dans les vaisseaux systémiques (Une différence avait déjà été constatée pour différentes substances d'origine placentaire).
- Le fait que l'ocytocinase représente encore 40% de la valeur à terme 7 jours après celui-ci est en contraste avec la chute rapide d'autres substances comme p.ex. les oestrogènes, la progestérone et les gonadotropines chorioniques (En fait, ceci s'expliquera plus tard par la demi-vie relativement longue de l'enzyme).
- Finalement, l'ocytocinase extraite du placenta semble se comporter quelque peu différemment vis-à-vis de certains inhibiteurs que l'ocytocinase sérique.

Par la suite, toutefois, diverses études cliniques, biochimiques et histochimiques confirmeront l'origine placentaire de la cystine aminopeptidase (7,41,42,44,45,63,65, 68,89,90).

En résumé, la cystine aminopeptidase, substance préssentie il y a près de 40 ans, a vu sa nature enzymatique précisée en 1941. Son mécanisme d'action sera démontré en 1957 et son origine placentaire généralement admise 4 ans plus tard.

IV. METHODES DE DOSAGE

A. Les méthodes biologiques

La première méthode de dosage décrite dans la littérature date de 1939 (20). Cependant, ce sont les travaux de Page (57) qui ont le plus contribué au "renom" de l'ocytocinase : A une certaine quantité de sérum de femme enceinte (env. 50 ml), on ajoutait quelques gouttes de toluène afin de stabiliser le plasma et 5 UI. de Pitocine. Ce mélange était ensuite séparé en différents échantillons placés en incubateur à 37° (durant des temps différents). On déterminait alors pour chaque échantillon le pourcentage de Pitocine non inactivée selon son effet sur les cornes utérines du rat.

Page voyait alors dans le dosage de la "Pitocinase" un test de grossesse relativement précis d'une part et, d'autre part, un moyen de dater la conception avec une marge d'erreur de plus ou moins 6 jours.

Depuis lors, toutes les méthodes de dosage qui seront développées selon des techniques biologiques, sont pour la plupart longues et présentent le gros désavantage d'être difficilement comparables entre elles. Leur coéfficient de variation selon Melander (54) varie entre 15 et 21% (voir définition de ce terme en page 25)

Tableau 3 : Ocytocinase : méthodes biologiques de dosage.

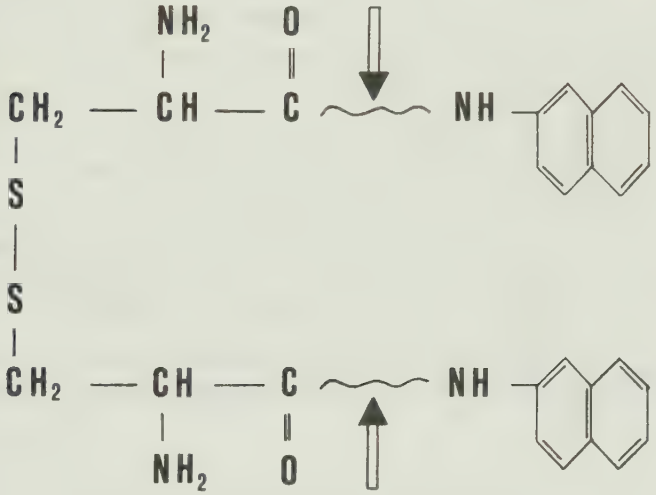
Lapin en période de lactation	Effet lactogène (inj. dans A mammaire perf. i.v.)	Relativement précise et spécifique. Onéreuse. Prenant du temps.	Van Dyke et al. 1955 (86) Fitzpatric 1961 (29) Mendez-Bauer et al. 1961 (
Rat	Contraction de l'utérus isolé. Utérus surperfusé.	Précise, fiable. Relativement rapide.	Holton 1948 (38) Bisset et Walker 1954 (8) Fitzpatric 1961 (29) Wiqvist et al. 1962 (95)
Poulet	TA	Précise. Rapide. Facile	Coon 1939 (20) Elmqvist 1957 (25)
Lapin	Induction du travail	Stimulation d'une fonction physiologique. Longue.	Berde et Cerletti 1958 (6)
Rat	Contractions	Pas fiable pour du travail quantitatif.	Berde et al. 1957 (5)

Légende : Ce tableau résume les différentes méthodes biologiques de dosage de l'ocytocinase : animal de laboratoire choisi, effet mesuré, qualité propre de la méthode considérée et leurs auteurs respectifs.
Tableau adapté de Melander (54).

B. Les méthodes chimiques

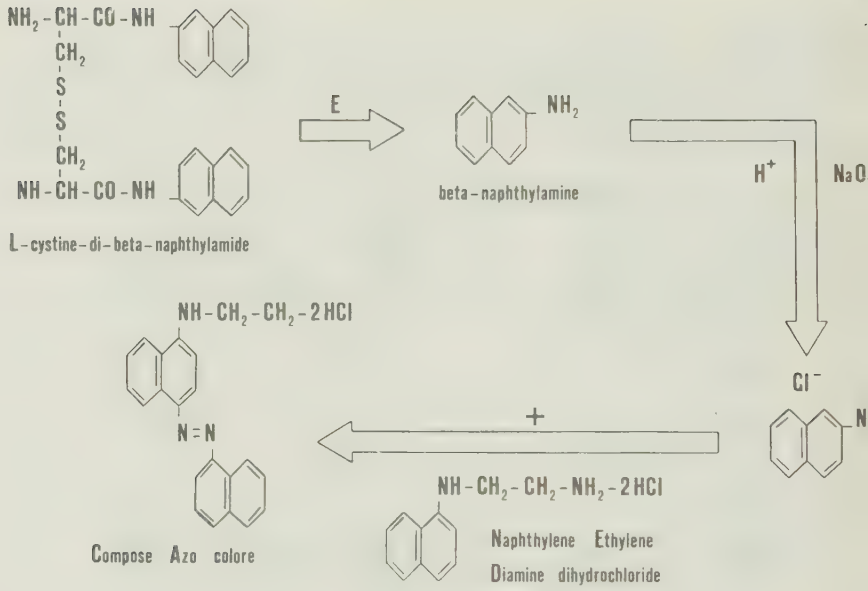
Dès 1957, un substrat chimique synthétique sera utilisé pour la première fois dans une technique de dosage : il s'agit de la L-cystine-di-béta-naphtylamide (80).

Tableau 4 : Structure chimique de la L-cystine-di-béta-naphtylamide.



Légende : ⟹ Site d'action de l'ocytocinase sur la L-cystine-di-béta-naphtylamide.

Tableau 5 : L-cystine-di-béta-naphtylamide - Ocytocinase.



Légende : Schéma emprunté à Melander (54) montrant le détail de la réaction conduisant à un composé Azo coloré permettant un dosage colorimétrique.

Cette méthode sera développée cliniquement 2 ans plus tard (56).

La précision de cette méthode chimique est supérieure à celle des méthodes biologiques et son coéfficient de variation (voir définition de ce terme en page 25) varie entre 4,7% et 14,2% (17,54).

D'autres substrats chimiques analogues vont également être utilisés, la L-leucine-béta-naphtylamide (9,70,80), la L-alanine-béta-naphtylamide (80), la L-glycine-béta-naphtylamide (80). Toutes ces méthodes dérivées en fait de la méthode initiale sont relativement longues. Cependant, différentes modifications techniques ont néanmoins réussi à abaisser le temps nécessaire à ces déterminations de 8 heures (qui était le temps primitivement décrit en 1957) à env. 2 heures (50). D'autres auteurs, à partir du même substrat, vont décrire une méthode de mesure par fluorimétrie directe (10,62,71) avec un coéfficient de variation extrêmement bas de 1,64% (10) (voir définition de ce terme en page 25). Pour mémoire, signalons également une méthode isotopique (40) et une méthode polarographique (3).

En 1962, un autre type de substrat chimique synthétique est utilisé dans les méthodes de dosage : la L-cystine-bis-p-nitroanilide (83).

Les méthodes de dosage utilisant cette substance ne se sont développées que récemment, lorsqu'il est apparu que les techniques de dosage utilisant un substrat chimique de type naphtylamide n'étaient pas dépourvues de danger, certains composés formés lors de la réaction ayant des propriétés carcinogènes. Ce fait a certainement représenté un obstacle pratique au développement de routine de

l'ocytocinase comme index de la fonction placentaire (12).

Le nouveau substrat est hydrolisé deux fois plus rapidement par la cystine-aminopeptidase sérique que les dérivés de la naphtylamide (80). Il présente cependant certains inconvénients : Il est difficile à synthétiser et à purifier, et n'est que peu soluble dans l'eau.

C'est la raison pour laquelle il sera progressivement remplacé par un autre dérivé de la nitroanilide : la S-benzyl-L-cystéine-p-nitroanilide.

Ce composé, en présence de la cystine-aminopeptidase, montre un taux de réaction environ 39 fois plus rapide que celui qu'on observe en employant la L-cystine-bis-p-nitroanilide (83). Au moyen de ces deux nouveaux composés, trois types principaux de méthodes vont se développer :

1 - Des méthodes "cinétiques", au cours desquelles on suit la réaction enzymatique durant un certain laps de temps, ce qui permet de mesurer une différence d'absorption au spectrophotomètre (12,78,91). Ce type de méthode présente l'avantage d'une part que l'on peut suivre le progrès de la réaction durant la mesure et, d'autre part, qu'aucun "blanc" n'est nécessaire (85).
2 - Des méthodes spectrophotométriques, au cours desquelles la réaction enzymatique est stoppée à un moment donné par l'adjonction d'un acide, en général l'acide acétique ou l'acide trichloracétique (23,52).
3 - Des méthodes colorimétriques, au cours desquelles la diazotation de la p-nitroaniline libérée par hydrolyse enzymatique est suivie par une conversion en un complexe azo coloré par couplage avec la

N-(1-naphtyl)ethylenediamine (85). Ce type de méthode - pour ce qui est de la réaction enzymatique - est analogue à celui décrit en détail pour la naphtylamide dans le tableau 5.

L'avantage des méthodes spectrophotométriques et colorimétriques sur les méthodes "cinétiques" est de pouvoir être utilisées sans des analyseurs de taux de réaction, ni autre équipement sophistiqué.

Certaines de ces méthodes ont connu des développements automatisés ce qui permet un dosage extrêmement rapide et leur confèrent des coéfficients de variation extrêmement faibles (11,59,78).

Si l'on compare les méthodes biologiques aux méthodes chimiques, on peut dire que les premières valent, par leur spécifité (en effet, les substrats chimiques sont également sensibles - la p-nitroanilide dans une mesure moindre - à des aminopeptidases d'origine hépatique et pancréatique) (73), mais que les méthodes chimiques sont supérieures par leur caractère de reproductibilité, de précision et, généralement, de simplicité.

Tableau 6 : OCYTOCINASE : Méthodes de dosage non biologiques.

Substrat	Méthode	
1 - L-Cystine-di-β-naphtylamide	dosage colorimétrique (4,7-14,2%)	(17,54)
(L-leucine-β-naphtylamide)	dosage spectrophotométrique (2%)	(50)
(L-alamine-β-naphtylamide)	dosage fluorimétrique (1,64%)	(10,40,71)
(L-glycine-β-naphtylamide)		
	- méthode isotopique (40)	
	- méthode polarographique (3)	
2 - L-Cystine-bis-p-nitroanilide	dosage "cinétique" 1,9-7,2%)	(59,73,78)
	dosage colorimétrique (1,2%)	(85)
	dosage spectrophotométrique (7%)	(73)
3 - S-benzyl-L-cystéine-p-nitroanilide:	dosage "cinétique" (1,1-6%)	(73,87)
	dosage colorimétrique (1,3%)	(85)
	dosage spectrophotométrique (2-10%)	(23,72)

Légende : Ce tableau résume les différents substrats chimiques utilisés pour le dosage de "l'ocytocinase" ainsi que les types de méthode de dosage utilisés.
(les pourcentages ( ) représentent la valeur du coéfficient de variation indiqué par les auteurs)

V. METHODE DE DOSAGE (51)

A. Principe du dosage

Sous l'action de la cystine aminopeptidase, le substrat (S-benzyl-L-cystéine-p-nitroanilide) libère de la p-nitroaniline qui absorbe à 380 nm. La réaction enzymatique est arrêtée par de l'acide acétique.

B. Réactifs

1. Tampon phosphate de potassium 0,1M pH 7,0 (partir de $KH_2\ PO_4$ et ajuster le pH avec KOH concentré).
2. Substrat S-benzyl-L-cystéine-p-nitroanilide 5 mM dans du méthoxyéthanol (16,6 mg/10 ml). $C_6H_5CH_2SCH_2(NH_2)CONHC_6H_4NO_2$.
   Se conserve une semaine au frigidaire en flacon brun.
   Le substrat est sensible à la lumière.
3. Acide acétique à 25%.

C. Mode opératoire

On introduit dans des tubes de verre de 5 ml :
- 1,8 ml de tampon
- 0,01 ml de sérum (0,05 si la grossesse est inférieure à 12 semaines)
- 0,01 de NaCl 9 o/oo pour la confection du blanc.

Après mélange, on laisse les tubes cinq minutes dans un bain d'eau à 37°C pour en équilibrer la température. On ajoute ensuite 0,2 ml de substrat, on mélange rapidement, puis on remet les tubes dans le bain-marie à 37°C à l'abri

de la lumière. Après exactement trente minutes d'incubation, on arrête la réaction par 1 ml d'acide acétique à 25%.

Après mélange, on mesure l'absorption du mélange réactionnel à 380 nm dans un spectrophotomètre à aspiration dont le zéro a été réglé sur le blanc.

D. Calcul des résultats

Volume final : 3,01 ml
Volume de sérum : 0,01 ml
Durée d'incubation : 30 minutes

Coéfficient d'absorption millimolaire de la p-nitroaniline : 12,8

Activité : $\frac{3,01 \times DO \times 1000}{12,8 \times 30 \times 0,01} = 784 \times DO$ en UI

NB. DO = densité optique; UI = unités internationales.

Si l'activité de la CAP (cystine-aminopeptidase ou "ocytocinase") est très faible (stade précoce de la grossesse, ou femme non-enceinte), on réalise le dosage sur 0,05 ml de sérum et le calcul de l'activité devient :

Activité : $\frac{3,05 \times DO \times 1000}{12,8 \times 30 \times 0,05} = 159 \times DO$ en UI.

VI. CONTROLE DE PRECISION

Avant de passer à la détermination d'une courbe des valeurs normales de "l'ocytocinase au cours de la grossesse", il nous est apparu préférable de procéder à une étude préliminaire de la méthode sous la forme d'un contrôle de précision. Pour ce faire, nous avons suivi la méthode décrite par Stamm (74).

Quelques définitions :

n = nombre de mesures dans le cas présent

Σ = somme

$\bar{X}$ = moyenne arithmétique : $\bar{X} = \frac{\Sigma x^1}{n}$ (x^1 = valeur de chaque mesure)

S = écart-type : $S = \sqrt{\frac{\Sigma (x^1 - \bar{X})^2}{n - 1}}$

V = coéfficient de variation : $V = \frac{S \cdot 100}{\bar{X}}$

Cet auteur conseille de procéder, avant tout développement clinique d'un dosage, à un contrôle préalable sous la forme de dosages répétés (20 x) sur un échantillon à valeur fixe connue.

Comme nous ne possédions pas d'échantillon de référence à valeur connue pour le dosage de contrôle, nous avons "confectionné" cet échantillon à partir d'un sérum prélevé sur une patiente admise dans le service pour un hydramnios artificiel.

Après centrifugation, nous avons confectionné des échantillons de mesure qui ont été divisés en deux séries de 20

échantillons chacune, puis congelés.

Dès lors, comme il est décrit dans l'étude de Stamm, nous avons dosé 5 jours par semaine un échantillon de chacune des deux séries et ce durant 4 semaines.

Tableau 7 : Etude ocytocinase - Contrôle de précision

Jours Mois (fév-mars)	Jours Sem.	Première série	Seconde série
9	Lu	22,74	25,09
10	Ma	29,01	25,09
11	Me	28,22	32,93
12	Je	20,38	17,25
13	Ve	18,82	25,09
16	Lu	18,82	26,66
17	Ma	21,95	25,09
18	Me	15,68	18,82
19	Je	37,63	36,06
20	Ve	31,36	32,93
23	Lu	34,50	36,85
24	Ma	30,58	24,30
25	Me	21,95	29,01
26	Je	29,01	27,44
27	Ve	32,93	27,44
1	Lu	32,14	29,01
2	Ma	29,01	28,22
3	Me	32,93	38,42
4	Je	29,79	23,52
5	Ve	30,58	26,66

Légende : Ce tableau donne les valeurs numériques des dosages répétés durant 4 semaines sur les échantillons de nos deux séries de contrôle.

Pour la série no 1, nous avons :

a) $\bar{X} = 27,40$
$S = 6,08$
$V = 22,19\%$ } (1)

Pour la série no 2 :

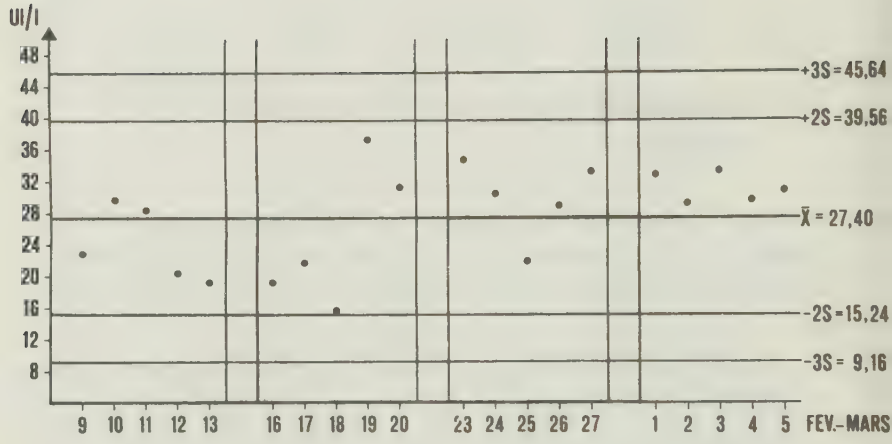
$\bar{X} = 27,79$
$S = 5,49$
$V = 19,76\%$ } (2)

N.B. Les chiffres entre parenthèses se rapportent au tableau no 12.

Si nous considérons maintenant graphiquement ces résultats, comme il est conseillé de le faire dans toute période préliminaire au dosage, nous voyons que (voir tableaux 8 et 9) :

- Toutes les valeurs se trouvent dans les limites de confiance (les limites de confiance sont définies par la valeur moyenne plus ou moins 2 fois l'écart-type, les limites de contrôle étant définies par la valeur moyenne plus ou moins 3 fois l'écart-type).
- 7 valeurs successives ne montrent pas une tendance à augmenter.
- 7 valeurs successives ne montrent pas une tendance à diminuer.
- Dans l'échantillon no 1, à la fin de la période de mesure, nous trouvons 7 valeurs successives qui se trouvent d'un seul et même côté par rapport à la moyenne. Ce fait peut faire suspecter une erreur fortuite. Cependant, comme nous n'avons pas observé ce phénomène lors des mesures sur la seconde série d'échantillons, nous pouvons donc exclure ce type d'erreur.

Tableau 8 : OCYTOCINASE - Contrôle de précision



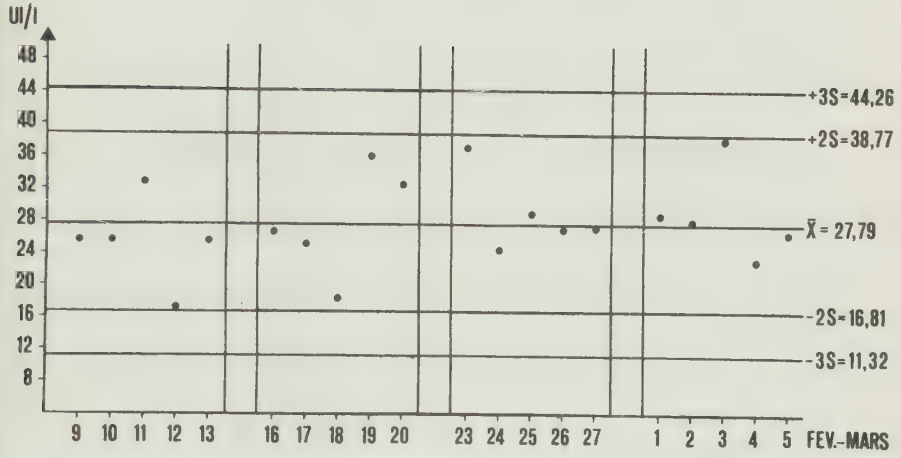
Légende : Représentation graphique des valeurs de dosage d'un même sérum divisé en une première série de 20 échantillons.

$\bar{X}$ = valeur moyenne

$\bar{X}+2S$ = limites de confiance

$\bar{X}+3S$ = limites de contrôle

Tableau 9 : OCYTOCINASE - Contrôle de précision



Légende : Représentation graphique des valeurs de dosage d'un même sérum divisé en une seconde série de 20 échantillons.

$\bar{X}$ = valeur moyenne

$\bar{X} \pm 2S$ = limites de confiance

$\bar{X} \pm 3S$ = limites de contrôle

Toujours parce que nous ne possédions pas de solution standard à valeur connue, nous avons recouru à un petit artifice pour exclure une erreur systématique. Nous avons reçu des séra congelés de Belgique, séra dans lesquels l'ocytocinase avait été déterminée par le laboratoire de chimie pathologique de l'Université Libre de Bruxelles (ces séra ont été mis à notre disposition par le Dr H. Kleiner que nous tenons à remercier une fois encore ici).

Tableau 10 : Comparaison des valeurs de l'ocytocinase

	Valeurs "belges"	Valeurs "lausannoises"
1.	280 UI.	253,23 UI.
2.	230	206,19
3.	405	399,06
4.	200	173,26
5.	235	233,63
6.	112	90,16
7.	270	219,25
8.	280	274,52
9.	270	235,98
10.	185	196,00

Légende : Valeurs de dosage de l'ocytocinase à Bruxelles et à Lausanne sur des échantillons identiques congelés.

L'examen de ces différentes valeurs montre - à l'exception de la valeur no 6 - que les résultats sont comparables si l'on tient compte d'un coéfficient de variabilité d'env. 10% dans le laboratoire de chimie pathologique de Bruxelles (51) et de notre propre coéfficient.

Arrivé à ce stade de notre étude préliminaire, il nous est apparu que, même si cette méthode de dosage se situait dans les limites de fiabilité, notre coéfficient de variabilité était relativement élevé. Il devenait dès lors très intéressant de chercher quelles pouvaient en être les raisons. Pour ce faire, il était nécessaire d'examiner les différents temps de cette méthode.

Nous nous sommes tout d'abord demandés dans quelle mesure le facteur humain pouvait intervenir, c'est-à-dire dans quelle mesure l'habitude du dosage allait "améliorer" nos résultats. Pour ce faire, nous avons tout d'abord repris nos chiffres de contrôle de précision et nous avons étudié les valeurs moyennes, écart-type et coéfficient de variation non plus sur 4 semaines, mais seulement sur 2 semaines. Ces résultats sont groupés dans le tableau no 11.

Tableau 11 : Ocytocinase - Contrôle de précision

A. - Semaine 1 et 2				B. - Semaine 3 et 4			
Série 1		Série 2		Série 1		Série 2	
$\bar{X}$ = 24,46		$\bar{X}$ = 26,50		$\bar{X}$ = 30,34		$\bar{X}$ = 29,09	
S = 6,85	(3)	S = 6,02	(4)	S = 3,47	(5)	S = 4,83	(6)
V = 28,00%		V = 22,72%		V = 11,44%		V = 16,60%	

Légende : Les valeurs moyennes ($\bar{X}$) écarts-types (S) et coéfficients de variation (V) sont calculés sur 2 séries de 2 semaines (au lieu de 4 précédemment).
Les chiffres entre parenthèses se rapportent au tableau 12.

Par la suite, nous avons de nouveau procédé à un essai court de 5 jours sur notre même "standard" et nous avons

obtenu un coéfficient de variation de 16,57% (7) : voir tableau no 12.

Ces différents chiffres, s'ils ne sont significatifs que dans la première série d'échantillons, montrent néanmoins une tendance à l'amélioration de notre coéfficient de variation et, sans vouloir tirer des conclusions définitives de ces valeurs, on peut cependant admettre que la routine de dosage de la laborantine favorise la reproductibilité de nos résultats et par là améliorera notre coéfficient de variation.

Une autre explication de notre coéfficient de variation relativement élevé tient à la manière même de la calculer. En effet, nous avons choisi, suivant en cela Stamm (74), la formule de l'écart-type* d'où l'on tire le coéfficient de variation. Cependant, on trouve dans la littérature (17,71) une manière différente de calculer l'écart-type et par là, le coéfficient de variation[1] :

$$* \quad S = \sqrt{\frac{(x^1 - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

$$1 \quad S = \sqrt{\frac{(x^1 - \bar{X})^2}{2\,n}}$$

$$\Rightarrow V = \frac{S \,.\, 100}{\bar{X}}$$

Si l'on utilise cette formule pour nos résultats, ceux-ci s'en trouvent sensiblement améliorés.
Voir tableau no 12.

Tableau 12 : Ecarts-types et coéfficients de variation comparés.

	$S = \sqrt{\frac{\Sigma (d)^2}{n-1}}$ (74)	$S = \sqrt{\frac{\Sigma (d)^2}{2n}}$ (17,71)
(1)	s = 6.08	s = 4.19
	v = 22,19 %	v = 15,29 %
(2)	s = 5,49	s = 3,79
	v = 19,76 %	v = 13,64 %
(3)	s = 6,85	s = 4,60
	v = 28,00 %	v = 18,80 %
(4)	s = 6,02	s = 4,04
	v = 22,72 %	v = 15,24 %
(5)	s = 3,47	s = 2,33
	v = 11,44 %	v = 7,60 %
(6)	s = 4,83	s = 3,24
	v = 16,60 %	v = 11,14 %
(7)	s = 6,52	s = 4,13
	v = 16,57 %	v = 10,49 %

Légende : Ce tableau compare nos résultats cités précédemment selon la manière de calculer l'écart-type (s)
(1-7) voir pages précédentes

N.B. $d = (x^1 - \bar{X})$

Si maintenant nous considérons la méthode de dosage et son principe, on peut faire les remarques suivantes :

- La conservation des séra, si l'on suit la littérature peut se faire sans modification enzymatique si le sérum est conservé 24 heures à $4^{o}C$ et pratiquement indéfiniment s'il est congelé (39,54,67,76,78). Cette constatation va de pair avec les études qui avaient été faites sur l'enzyme purifié qui montraient que celui-ci était détruit par ébullition rapidement et lentement à 57^{o}, mais que, par contre, conservé au frigidaire dans des conditions anaérobiques, il pouvait être conservé des mois (79). Toutefois, cette notion n'est pas admise par tout le monde, c'est ainsi que Tovey (77) prétend que les échantillons conservés durant 1 nuit à 4^{o} ou à moins 25^{o} plus longtemps, peuvent montrer un taux de variation de près de 25%. Dans le cadre de notre étude, le sang de notre "patiente standard" a été centrifugé de suite après le prélèvement et le sérum congelé immédiatement.
- En ce qui concerne le substrat, il est sensible à la lumière d'une part et, d'autre part, se conserve 1 semaine à $4^{o}C$. Lorsque l'on est amené à employer ce substrat tous les jours, il va sans dire qu'une certaine exposition à la lumière ne peut être évitée et que la température du substrat peut subir quelques modifications, les deux facteurs ayant probablement ainsi une certaine responsabilité dans une dégradation relative. Pour nous faire une idée de cette dégradation éventuelle, nous avons procédé, toujours sur notre "standard", à des mesures durant 1 semaine au moyen d'un substrat confectionné au jour le jour :

Mesures faites 5 jours de suite avec un substrat confectionné au jour le jour.

S = 4,04 (2,55)

V = 10,74% (6,78%)

N.B. Les chiffres entre parenthèses sont les valeurs calculées avec la formule

$$S = \sqrt{\frac{\sum (d)^2}{2\,n}} \quad \text{ou} \quad d = x^1 - \bar{x}$$

Il n'est pas possible de tirer une conclusion définitive de tels chiffres. On constate néanmoins que le coéfficient de variation est meilleur que dans notre étude préalable, ce qui peut s'expliquer d'une part par une certaine routine de nos laborantines - comme suggéré précédemment - mais il est probable que le fait de confectionner le substrat au jour le jour intervient également pour une certaine part dans cette amélioration.

- En suivant le mode opératoire, on note qu'il faut pipeter dans un tube de verre de 5 ml une quantité de 1,8 ml de tampon. Une telle quantité n'est pas "pratique" selon nos laborantines. En effet, nous n'avons pas de pipettes adaptées à de telles doses (pipette trop grosse) et il est probable que ce pipetage est entâché d'un certain taux d'erreur (1% au moins pour une laborantine expérimentée ce qui est le cas dans notre laboratoire).
- Pour ce qui est de la quantité de sérum pipeté : 0,01 ml Cette opération se fait au moyen de pipettes "automatiques" ce qui garantit une bonne précision.
- Le mélange des tubes nous a également posé quelques problèmes. Ce mélange - sur la qualité duquel on in-

siste beaucoup dans la littérature (37) - se fait chez nous au moyen d'un agitateur électrique. Si cet appareil garantit la qualité du mélange, il présente le risque d'une certaine perte de liquide. Nous avons renoncé à boucher les tubes, nos bouchons de cellulose étant susceptibles d'absorber une certaine quantité de liquide. Il y a donc là de nouveau une possibilité d'erreur par perte de liquide.

- L'équilibration de la température à 37° dans un bain-marie s'est faite sans problèmes et ceci quel que soit le type de tube utilisé.
- Sur le plan technique, l'adjonction de 0,2 ml de substrat peut se faire de façon précise car pour une telle quantité, l'on dispose de pipettes "automatiques".
- Le temps d'incubation de 30 minutes, à l'abri de la lumière et dans un bain-marie à 37°C, ne s'est pas fait sans difficultés. Nous avons constaté, en effet, une condensation importante sur les parois de notre incubateur. Dans un premier temps, nous avons essayé de faire disparaître cette condensation en tapissant les parois avec de la mousse synthétique. Cela ne s'est toutefois pas révélé satisfaisant et nous faisait courir donc le risque d'une certaine contamination de nos tubes placés dans l'incubateur. Dans ces conditions, durant ce temps de 30 minutes, les tubes ont été fermés par des bouchons de cellulose. La restriction faite quant à ces bouchons durant l'agitation mécanique n'étant plus valable pour ce temps de l'opération.
- Le problème du minutage est également important et s'est révélé ardu. En effet, comme nous procédons par séries de 10 mesures, la présence de deux laborantines est indispensable pour que ce temps de 30 minutes entre l'adjonction des substrats et celle de l'acide acétique soit aussi précis que possible. Cela signifie en effet

qu'il faut, dans un premier temps sortir les tubes de l'incubateur, les déboucher, ajouter le substrat, les mélanger, puis les remettre dans cet incubateur pour permettre à la réaction de se faire durant 30 minutes. Du point de vue technique, cette opération est relativement difficile et présente un certain risque de contamination des tubes au moment où ils sont sortis de l'incubateur après 5 minutes. Par ailleurs, même en procédant de façon soigneuse et rapide, un certain degré de contamination lumineuse ne peut être évité.

- La réaction est arrêtée par de l'acide acétique à 25%. Selon la littérature, l'acide trichloracétique à 10% pourrait présenter certains avantages, en particulier en diminuant un certain degré de turpitude du liquide (22,76). Nous avons également procédé à une petite série de mesures en remplaçant l'acide acétique par de l'acide trichloracétique. Toutefois, les résultats que nous avons obtenus étaient sensiblement moins bons que ceux observés avec l'acide acétique.
- Finalement, la mesure à 380 nm (cette longueur d'ondes est choisie en fonction du taux maximum d'absorption du produit formé par hydrolyse : la p-nitroaniline alors que le produit non hydrolysé a une absorption négligeable à cette longueur d'ondes (18)) est grèvée d'un certain coéfficient d'erreur certes faible, mais inhérent à ce type de mesure, donc non suppressible.

Conclusions :

Pour conclure cette étude de qualité, nous pouvons dire que notre méthode se situe dans les limites de confiance et à plus forte raison dans les limites de contrôle. Cependant, notre coéfficient de variation montre une reproductibilité de nos résultats relativement faible, bien que

l'usage soit susceptible de l'améliorer. La confection du substrat au jour le jour peut également, dans une certaine mesure, nous donner de meilleurs résultats. Il reste néanmoins que ce type de méthode, de par son mode opératoire, est entaché d'un certain taux d'erreur possible que l'usage - par le biais d'un dosage de routine - ne saurait supprimer complètement.

Dans ces conditions, sans se prononcer sur la valeur de l'ocytocinase comme index de la fonction placentaire, on peut dire que cette méthode de dosage interdit de tirer des conclusions sur une seule mesure et que seules des mesures sériées sont susceptibles d'être interprêtées dans le contexte de la surveillance d'une grossesse.

VII. OCYTOCINASE : VALEURS AU COURS DE LA GROSSESSE NORMALE.

Pour déterminer les valeurs de l'ocytocinase au cours d'une grossesse normale, nous avons eu recours à notre service de policlinique, plus particulièrement aux femmes enceintes contrôlées dans le service.

La normalité de la grossesse a été établie dans le cadre de notre étude par exclusion :

- Une grossesse était dite "normale" si elle ne présentait à aucun moment un problème de gestose, une infection sévère, un diabète, un retard de croissance intra-utérin, une incompatibilité rhésus ou une pathologie placentaire.

Par ailleurs, toutes les grossesses ayant présenté une menace au cours de leur évolution ont été éliminées de notre collectif.

Nous avons donc procédé à la prise de 691 échantillons sanguins sur 360 patientes. Le calcul des semaines de grossesse a été fait selon le mode en vigueur à la Maternité du CHUV, soit le calcul tout d'abord du terme présumé : DR + 10 jours, moins 3 mois = terme présumé, et à partir de là des différentes semaines.

Cette manière de calculer reste approximative puisqu'une semaine signifie en fait 7 jours de l'évolution de la grossesse. Cependant, en tenant compte de la demi-vie relativement longue de cet enzyme, cette approximation ne nous semble pas bien grave. Lors du calcul de la semaine de grossesse, tous les cas où les dernières règles n'étaient

pas certaines ont été éliminés, de même que tous les cas de patientes présentant des irrégularités cycliques.

Finalement, nous n'avons pas tenu compte des échantillons qui présentaient un certain degré d'hémolyse, fût-il minime.

Nos résultats sont groupés dans le tableau no 13. Exprimé graphiquement, les valeurs normales de l'ocytocinase se retrouvent dans le tableau no 14.

Tableau 13 : OCYTOCINASE - Valeur moyenne (UI) et déviation standard

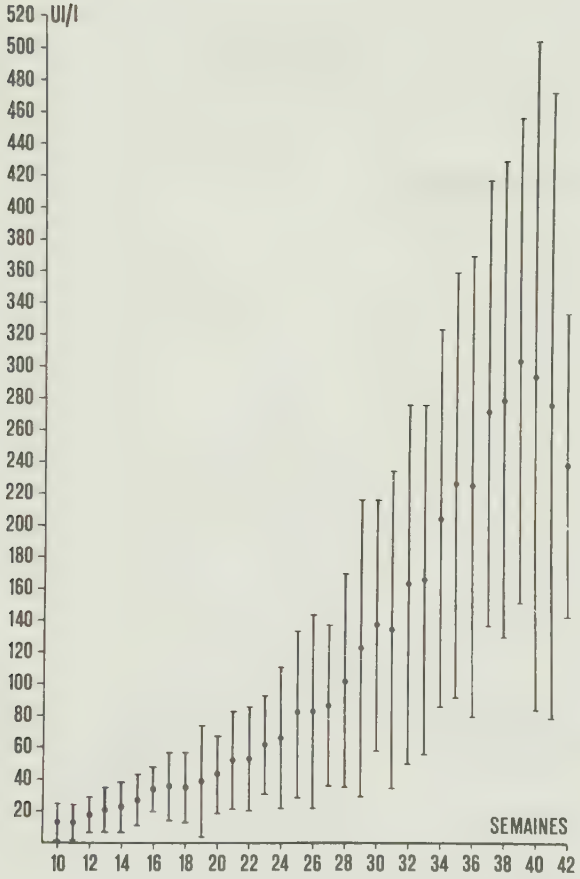
10 sem.	n = 15	$\bar{X}$ = 13,31	S = 5,95
		(x +/- 2 S =	1,41 - 25,21)
11 sem.	n = 15	$\bar{X}$ = 12,96	S = 5,53
		(x +/- 2 S =	1,91 - 24,03)
12 sem.	n = 16	$\bar{X}$ = 18,26	S = 5,44
		(x +/- 2 S =	7,38 - 29,14)
13 sem.	n = 23	$\bar{X}$ = 20,98	S = 7,10
		(x +/- 2 S =	6,78 - 35,18)
14 sem.	n = 17	$\bar{X}$ = 22,86	S = 7,97
		(x +/- 2 S =	6,92 - 38,80)
15 sem.	n = 19	$\bar{X}$ = 27,67	S = 8,02
		(x +/- 2 S =	11,63 - 43,71)
16 sem.	n = 17	$\bar{X}$ = 34,17	S = 7,01
		(x +/- 2 S =	20,15 - 48,19)
17 sem.	n = 22	$\bar{X}$ = 35,96	S = 10,67
		(x +/- 2 S =	14,62 - 57,30)
18 sem.	n = 20	$\bar{X}$ = 35,09	S = 10,91
		(x +/- 2 S =	13,27 - 56,91)
19 sem.	n = 26	$\bar{X}$ = 39,32	S = 17,53
		(x +/- 2 S =	4,26 - 74,38)
20 sem.	n = 26	$\bar{X}$ = 43,01	S = 12,06
		(x +/- 2 S =	18,89 - 67,13)

21 sem.	n = 23	$\bar{X}$ = 52,26	S = 15,63
		(x +/- 2 S = 21,00 - 83,52)	
22 sem.	n = 20	$\bar{X}$ = 53,70	S = 16,58
		(x +/- 2 S = 20,54 - 86,86)	
23 sem.	n = 24	$\bar{X}$ = 62,33	S = 15,55
		(x +/- 2 S = 31,23 - 93,43)	
24 sem.	n = 20	$\bar{X}$ = 66,91	S = 22,54
		(x +/- 2 S = 21,83 -111,99)	
25 sem.	n = 23	$\bar{X}$ = 82,21	S = 26,22
		(x +/- 2 S = 29,77 -134,65)	
26 sem.	n = 21	$\bar{X}$ = 83,54	S = 30,57
		(x +/- 2 S = 22,40 -144,68)	
27 sem.	n = 27	$\bar{X}$ = 87,45	S = 25,46
		(x +/- 2 S = 36,53 -138,37)	
28 sem.	n = 21	$\bar{X}$ = 102,78	S = 33,78
		(x +/- 2 S = 35,22 -170,34)	
29 sem.	n = 21	$\bar{X}$ = 123,54	S = 46,93
		(x +/- 2 S = 29,68 -217,40)	
30 sem.	n = 23	$\bar{X}$ = 137,98	S = 39,53
		(x +/- 2 S = 58,92 -217,04)	
31 sem.	n = 24	$\bar{X}$ = 135,47	S = 49,87
		(x +/- 2 S = 35,73 -235,21)	
32 sem.	n = 18	$\bar{X}$ = 164,16	S = 56,65
		(x +/- 2 S = 50,85 -277,46)	
33 sem.	n = 17	$\bar{X}$ = 166,78	S = 55,35
		(x +/- 2 S = 56,08 -277,48)	
34 sem.	n = 17	$\bar{X}$ = 205,71	S = 59,82
		(x +/- 2 S = 86,07 -325,35)	
35 sem.	n = 16	$\bar{X}$ = 227,21	S = 67,22
		(x +/- 2 S = 92,77 -361,65)	
36 sem.	n = 25	$\bar{X}$ = 226,13	S = 72,70
		(x +/- 2 S = 80,73 -371,53)	
37 sem.	n = 15	$\bar{X}$ = 273,62	S = 73,02
		(x +/- 2 S =137,58 -419,66)	
38 sem.	n = 25	$\bar{X}$ = 280,87	S = 75,14
		(x +/- 2 S =130,59 -431,15)	
39 sem.	n = 29	$\bar{X}$ = 305,24	S = 76,82
		(x +/- 2 S =151,60 -458,88)	
40 sem.	n = 28	$\bar{X}$ = 295,06	S = 105,42
		(x +/- 2 S = 84,22 -505,90)	

41 sem.	n = 24	$\bar{X}$ = 277,15	S = 98,84
		(x +/- 2 S = 79,47 -474,83)	
42 sem.	n = 16	$\bar{X}$ = 239,86	S = 48,03
		(x +/- 2 S =143,80 -335,92)	

Légende : Valeur de l'ocytocinase au cours de la grossesse normale (de la 10ème à la 42ème semaine) exprimée en UI avec valeur moyenne ($\bar{X}$) et déviation standard ($\bar{+}2S$).
n = nombre d'échantillons par semaine considérée

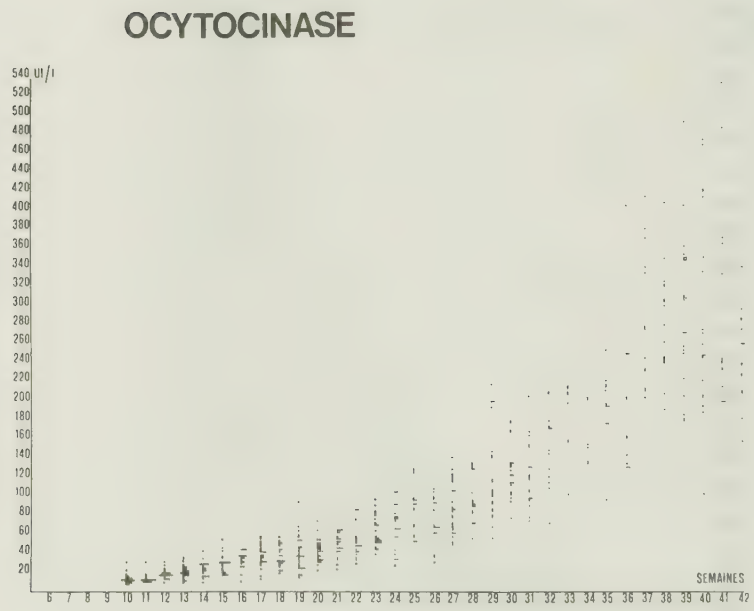
Tableau 14 : OCYTOCINASE - Valeurs moyennes $\bar{+}2S$



Légende : Représentation graphique des valeurs de l'ocytocinase au cours de la grossesse normale (de la 10ème à la 42ème semaine) avec les valeurs moyennes et 2 fois l'écart-type ($\bar{+}2S$).

Ces différentes valeurs sont également représentées sur le tableau no 15 sous la forme d'un "scattergramme.

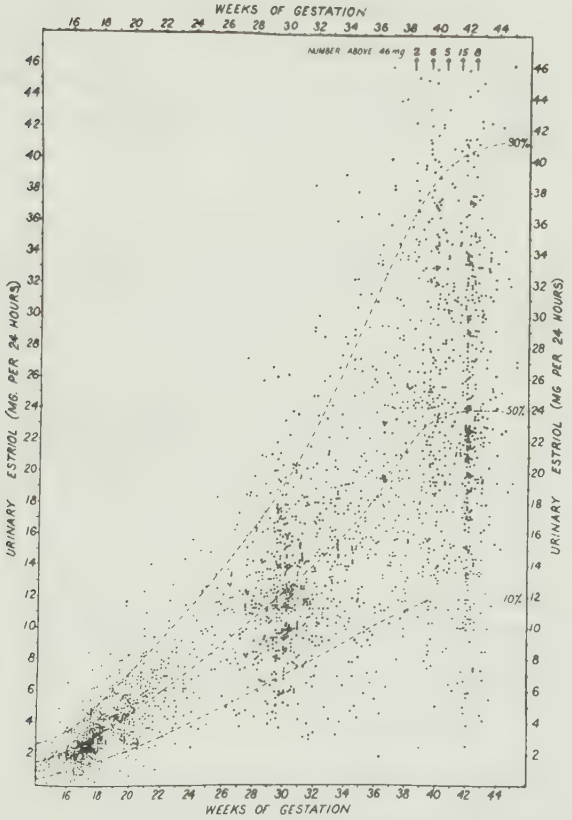
Tableau 15 : Scattergramme des valeurs de l'ocytocinase au cours de la grossesse normale.



Légende : Ces mesures ont été effectuées sur un collectif de 691 échantillons prélevés sur 360 patientes.

Ce dernier tableau fait apparaître la dispersion assez importante de nos résultats. Toutefois, à titre de comparaison, le tableau no 16 donne une représentation sous forme d'un "scattergramme" des valeurs de l'oestriol urinaire exprimé en mg/24h. (31).

Tableau 16 : Scattergramme de l'oestriol urinaire (grossesses normales) (31)



Estriol values in a normal obstetric population. The tenth, fiftieth, and ninetieth percentile lines are shown.

Légende : Valeurs de l'oestriol urinaire dans une population obstétricale normale avec indication des percentils

Tableau reproduit avec l'autorisation de C.V. Mosby Company, St-Louis, Missouri, USA. (31)

VIII. CONCLUSIONS

L'allure de notre courbe est semblable à celle décrite par Kleinert (communication personnelle) pour le même type de substrat et la même méthode. Une déviation standard relativement importante a également été constatée par cet auteur.

D'une façon plus générale, nous pouvons dire que l'allure exponentielle de notre courbe est similaire à celle que l'on retrouve dans la littérature (2,10,16,37,39,47,54,55, 60,61,64,71,77,82).

Pour ce qui est de la valeur de l'ocytocinase sérique comme index de la fonction placentaire, la détermination de valeurs normales uniquement rend une évaluation difficile.

Par ailleurs, comme pour la plupart des tests hormonaux, il apparaît nettement que seules des valeurs sériées au cours de la grossesse sont à même de donner des informations valables à l'obstétricien.

Il est donc nécessaire, avant de passer à un dosage clinique de routine, d'évaluer cette courbe "normale" en la confrontant avec des valeurs obtenues à partir de grossesses présentant une pathologie. Si l'on tient compte également de notre coéfficient de variation relativement élevé, il semble logique de penser, suivant en cela la littérature, que seules des mesures automatisées sont à même de satisfaire aux impératifs du dosage clinique de routine.

IX. - RESUME

Après un bref rappel de l'historique de l'ocytocine et de l'ocytocinase, nous avons passé en revue les différentes méthodes de dosage biologiques, puis chimiques de cet enzyme. Nous avons également procédé à un contrôle de précision de la méthode, contrôle qui s'est révélé satisfaisant.

Finalement, après évaluation des différents facteurs pouvant influencer défavorablement notre coéfficient de variation relativement élevé, nous avons procédé à la détermination de la courbe d'ocytocinase sérique au cours de la grossesse normale. Cette courbe est similaire à celle que l'on trouve dans la littérature.

X. BIBLIOGRAPHIE

1. ACHER, R. : Chemistry of Neurohypophysial Hormones. In : The Pituitary Gland. Vol. 3 p. 269-287. Harris G.W. and Donovan B.T. ed. (1966)

2. BABUNA, C., YENEN, E. : Enzymatic Determination of placental Function. Amer. J. Obstet. Gyn. 95 p. 925-934 (1966)

3. BARTIK, M. : Polarograficke dosovani oxytocinasy v plasme. Fol. Vet. 11 p. 15-24 (1967)

4. BASHORE, R.A. : Immunoassay of Oxytocin. Obst. Gynec. 29 p. 431 (1967)

5. BERDE, B., DOEPFNER, W., KONZETT, H. : Some pharmacological actions of four synthetic analogues of oxytocin. Brit. J. Pharmacol. 12 p.209-214 (1957)

6. BERDE, B., CERLETTI, A. : Quantitative comparison of substances related to oxytocin of new test. Acta Endocrinol. (Kbh) 27 p. 314-324 (1958)

7. BERNHARD, J. : Die Serum-Oxytizinase-Aktivität im Blut und in der Plazenta am Ende der Tragzeit. Zbl. Gynäk. 22 p. 785-788 (1967)

8. BISSET, G.W., WALKER, J.M. : Assay of Oxytocin in Blood. J. Physiol. London 126 p. 588-595 (1954)

9. BRESSLER, R., FORSYTH, D., EYLLING, P. : Serum leucine aminopeptidase activity in normal pregnancy and in patients with hydatiform mole. New Engl. Med. 261 p. 746-747 (1959)

10. CHAPMAN, L., SILK, E., SKUPNY, A., TOOTH, E.A. : Spectrofluorimetric Assay of Serum Cystine-aminopeptidase in normal and diabetic Pregnancy compared with total Oestrogen Excretion. J. Obstet. and Gynecol. Brit. Cwlth. 78 p. 435-443 (1971)

11. CHAPMAN, L., REGE, V.P., JOWETT, T.P., SILKE, E., TOOTH, E.A. : An Automated Method for the Assay of Serum Cystine-aminopeptidase in Pregnancy. Clin. Chim. Acta. 38 p. 339-345 (1972)

12. CHAPMAN, L., BURROWS-PEAKIN, R., REGE, V.P., SILKE E.: Comparison of L-Cystine-di-beta-naphtylamide and S-benzyl-L-cysteine-4-p-nitroanilide as Substrates for the Assay of Serum Cystine-aminopeptidase in Pregnancy. Clin. Chim. Acta. 51 p. 335-339 (1974)

13. CHARD, T., BOYD, N.R.H., FORSLING, M.L., Mc NEILLY, A.S., LANDON, J. : Development of radioimmuno-assay for oxytocin : the extraction of oxytocin plasma and its measurement during parturition in human and goad blood. J. Endocrinol. 53 p. 223-234 (1970)

14. CHARD, T., HUDSON, C.N., EDWARDS, C.R.W., BOYD, N.R.H.: Release of oxytocin and vasopressin by the human fetus during labor. Nature 234 p. 352-353 (1971)

15. CHARD, T. : The posterior pituitary and the induction of labour. Mem. Soc. Endocrinol. 20 p. 61-75 (1973)

16. CHRISTENSEN, A. : Hormone and Enzyme Assays in Pregnancy. I. Studies on the placental and the tissue Cystine-aminopeptidase activity in the peripherical plasma from non pregnant woman and in plasma from the umbilical cord. Acta Endocrinol. 76 p. 189-200 (1974)

17. CHRISTENSEN, A., FROYSHOV, D., EYLLING, P. : Hormone and Enzyme Assays in Pregnancy. III. The Human Chorionic Somatomammotrophin, Progesterone and Placental Cystine-aminopeptidase Levels in normal Pregnancy. Acta Endocrinol. 76 p. 201-208 (1974)

18. CHRISTENSEN, A., HAGELID, P.E. : Hormone and Enzyme Assays in Pregnancy. V. A rapide Method for measuring the placental Cystine-aminopeptidase using L-Cystine-bis-p-nitroanilide as substrate. Acta Endocrinol. 78 p. 212-217 (1975)

19. COCH, J.A., BROVETTO, J., CABOT, H.M., FIELITZ, C.A., CALDEYRO-BARCIA, R. : Oxytocin-equivalent Activity in the Plasma of Women in Labor and during Pregnancy. Amer. J. Obstet. Gyn. 91 p. 10-17 (1965)

20. COON, J.M. : A new method for the assay of posterior pituitary extracts. Arch. in Pharmacodyn. 62 p. 79-99 (1939)

21. COUTINHO, E.M. : Hormone induced ionic regulation of labor. Second International Congress of Endocrinology. Amsterdam 1964. Excerpta Medica Foundation, International Congress Series 64 p. 742-747.

22. CUTTING, W.C. : Handbook of Pharmacology. p. 246. Appleton Century Crofts New York, 3rd ed. (1967)

23. DURHAM, B.H. : Spectrophotometric end-point Method for Assay of Serum Cystine-aminopeptidase in Pregnancy. Cli. Chem. 22 p. 79-82 (1976)

24. DU VIGNEAUD, V., RESSLER, C., TRIPPET, S. : The Sequence of Amino Acids in Oxytocin with a Proposal for the Structure of Oxytocin. J. Biol. Chem. 205 p. 949-957 (1953)

25. ELMQVIST, A. : Synpunkten pa bestämning av felgränsen vid biologisk styrkebestämning av oxytocin. Svennsk. Framceutisk Tidskrift 64 p. 657-661 (1957)

26. FEKETE, K. : Beiträge zur Physiologie der Gravidität. Endokrinologie 7 p. 364-369 (1930)

27. FEKETE, K. : Gibt es während der Schwangerschaft ein aktives Hypophysen-Hinterlappenhormon im Blut ? Endokrinologie 10 p. 16-23 (1932)

28. FITZPATRICK, R.J. : Blood concentration of oxytocin in labor. J. Endocrinol. 22 p. 19-20 (1961)

29. FITZPATRICK, R.J. : The Estimation of small Amounts of Oxytocin in Blood. In : Oxytocin. p. 358-377. Caldeyro-Barcia R. and Heller, H., Eds. London (1961)

30. FITZPATRICK, R.J., WALMSLEY, C.R. : The release of oxytocin during parturition. In : Advances in Oxytocin Research. p. 51-73. Pinkerton, J.H. M. Ed. Pergamon Press (1965)

31. FLIEGNER, J.R.H. : Placental Function and Renal Tract Studies in Pre-Eclampsia with Proteinuria and long-term Maternal Consequences. Amer. J. Obstet. Gyn. 126 p. 212-217 (1976)

32. GIBBENS, G.L.D., BOYD, N.R.H., CHARD, T. : Spurt release of oxytocin during human labor. J. Endocrinol. 53 p. 54-55 (1972)

33. GIBBENS, G.L.D., CHARD, T. : Observations on maternal Oxytocin Release during human Labor and the Effect of intravenous Alcohol Administration. Amer. J. Obstet. Gyn. 126 p. 243-246 (1976)

34. GLICK, S.M., KUMARESAN, P., KAGEN, A., WHEELER, M. : Radioimmunoassay of Oxytocin. In : Protein and Polypeptide Hormones. p. 81-83. Margoulies, M., Ed. Amsterdam (1968)

35. HAWKER, R.W. : Inactivation of Antidiuretic Hormone and Oxytocin during Pregnancy. J. Exp. Physiol. 41 p. 301-308 (1956)

36. HAWKER, R.W., WALMSLEY, C.F., ROBERTS, V., BLACKSHAW, J.K., DOWNES, J.C. : Oxytocic activity of blood in parturient and lactating women. J. Clin. Endocrinol. 21 p. 985-995 (1961)

37. HENSLEIGH, P.A, KRANTZ, K.E. : Oxytocinase and placental function. Amer. J. Obstet. Gyn. 107 p. 1233-1240 (1970)

38. HOLTON, P. : A Modification of the Method of Dale and Laidlaw for Standardisation of Posterior Pituitary Extracts. Brit. J. Pharmacol. Chemoth. 3 p. 328-334 (1948)

39. HURRY, D.J., TOVEY, J.E., ROBINSON, D.A., BEYNON, C.L. : Cystine-Aminopeptidase in normal and complicated Pregnancies. J. Obstet. Gynec. ol. Brit. Cwlth. 79 p. 788-793 (1972)

40. JAMES, M.A.R., CHARD, T., FORSLING, J. : New assay for oxytocinase studies in vivo and in vitro. Endocrinol. 45 p. 7-8 (1969)

41. JAMES, N.T. : Histochemical Demonstration of Oxytocinase in the human Placenta. Nature. 210 p. 1276-1277 (1966)

42. JONEK, J., SKALBA, H., KLIMKIEWICZ, Z., DZIECIVCHOWICZ, L. : Das Verhalten der Leucin-aminopeptidase in verschiedenen Entwicklungsstadien der menschlichen Plazenta. Zbl. Gynäkol. 15 p. 514-520 (1965)

43. JURET, T., SUZOR, R., POLI-MARCHETTI, P. : Variations du pouvoir ocytocique au cours de la grossesse. Gynéc. et Obstét. 51 p. 122-130 (1952)

44. KLEINER, H., WILKIN, P., SNOECK, J. : Lokalisierung der Steroïd-Dehydrogenasen und der Leucin-Aminopeptidase in der menschlichen Plazenta. Geburtsh. Frauenheilk. 10 p. 986-988 (1962)

45. KLEINER, H., WILKIN, P. : Mise en évidence histochimique d'une activité leucine-aminopeptidasique dans le placenta humain normal. Gynéc. Obstét. 62 p. 191-203 (1963)

46. KLEINER, H., SCHRAM, E. : Séparation des isoenzymes hydrolisant la L-leucyl-beta-naphtylamide par électrophorèse verticale en gel d'amidon. Clin. Chim. Acta. 14 p. 377-385 (1966)

47. KLEINER, H., GRAFF, G. : Evolution de la L-leucyl-betta-naphtylamide-hydrolase (LNAse) sérique et de ses isoenzymes dans la grossesse humaine normale. Bull. Soc. Royale Belge Gyn. Obst. 37 p. 295-302 (1967)

48. KLEINER, H., BROUET-YAGER, M., GRAFF, G. : Serum L-leucyl-betta-naphtylamide hydrolase Activity in normal single and twin Pregnancies and in Pregnancies with fetal Dysmaturity. J. Obstet. Gynecol. Brit. Cwlth. 76 p. 127-130 (1969)

49. KLEINER, H., BROUET-YAGER, M. : Separation of L-cystinyl-di-betta-naphtylamide hydrolase ("bxytocinase") isoenzymes by acrylamid gel electrophoresis of human pregnancy sera. Clin. Chim. Acta 40 p. 177-180 (1972)

50. KLEINER, H., BROUET-YAGER, M. : Activité de la L-cystinyl-di-betta-naphtylamide hydrolase ("ocytocinase") sérique dans la grossesse normale, mesurée par une méthode chimique rapide. Clin. Chim. Acta. 48 p. 299-309 (1973)

51. KLEINER, H. : communication personnelle.

52. KUMARESAN, P., ANANDARANGAM, P.B., VASICKA, A. : Plasma Oxytocin Levels during human Pregnancy and Labor as determined by Radioimmunoassay. Amer. J. Obst. Gyn. 119 p. 215-223 (1974)

53. KUMARESAN, P., HAN, G.S., ANANDARAGNAM, P.B., VASICKA, A. : in press. Obst. and Gynec.

54. MELANDER, S. : Plasma Oxytocinase Activity : a methodological and clinical Study with special Reference to Pregnancy. Acta. Endocrinol. Suppl. 96 p. 8-94 (1965)

55. MENDEZ-BAUER, C.J., CARBALLO, M.A., CABOT, H.M., NEGREIROS DE PAIVA, C.E., GONZALEZ-PANIZZA, V.H. : Studies on Plasma Oxytocinase. In : Oxytocin. p. 325-335. Caldeyro-Barcia, R. and Heller, H., Eds. London (1961)

56. MULLER-HARTBURG, W., NESVADBA, H., TUPPY, H. : Die Anwendung einer chemischen Methode zur Bestimmung des Oxytocinase-Spiegels im Schwangeren Serum. Arch. Gynäkol. 191 p. 442-456 (1959)

57. PAGE, E.W. : The Value of Plasma Pitocinase Determinations in Obstetrics. Amer. J. Obstet. Gyn. 52 p. 1014-1021 (1946)

58. PAGE, E.W., TITUS, M.A., MOHUN, G., GLENDENING, M.B. : Origin and Distribution of Oxytocinase. Amer. J. Obstet. Gyn. 82 p. 1090-1095 (1961)

59. PEETERS, J.A.B.M. : Automated Determination of Serum Oxytocinase Activity. Cil. Chem. 18 p. 563-564 (1972)

60. RANGARAJON, N.S., LA CROIX, G.E. : Oxytocinase Levels in Pregnancy. Intern. J. Gynaec. Obst. 11 p. 85-89 (1973)

61. RIAD, A.M. : Studies on Pregnancy Serum Cystine-Aminopeptidase Activity "Oxytocinase". J. Obstet. Gynecol. Brit. Cwlth. 69 p.409-416 (1962)

62. ROTH, M. : Enzymes in Clinical Chemistry. In : Proceedings of Symposium on Enzymes in Clinical Chemistry. p. 10-16. Ruyssen R. and Vanderndriesche, Eds. Elsevier, Amsterdam (1966)

63. RYDEN, G. : Cystine-Aminopeptidase and Oxytocinase Activity in Pregnancy. Acta. Obstet. Gynec. Scand. 45 Suppl.3 p. 63-84 (1966)

64. RYDEN, G. : Cystine-Aminopeptidase Activity in Pregnancy. II Its clinical Application as an Index of placental Function. Acta. Obstet. Gynec. Scand. 51 p. 329-334 (1972)

65. SCIARRA, J.J., LONG, M.E. : Histochemical localisation of leucine-aminopeptidase in the human placenta. Anat. Rec. 145 p. 350 (1963)

66. SEMM, K. : Das Wehenproblem mit besonderer Berücksichtigung des Oxytocin-Oxytocinase-Haushaltes. Beilageheft zur Z. Geburtsh. 154 p. 215-218 (1960)

67. SEMM, K. : The Significance of Oxytocinase in Pregnancy and Labor. In : Oxytocin. p. 336-343. Caldeyro-Barcia, R. and Heller, H., Eds. London (1961)

68. SEMM, K., WAIDEL, E. : Histochemische Untersuchungen über die Serum-Oxytocinase Bildung im menschlichen Trophoblasten. Z. Geburtsh. Gynäkol. 158 p. 165-171 (1962)

69. SEPPALA, M., AHO, I., TISSARI, A., RUOSLAHTI, E. : Radioimmunoassay of Oxytocin in amniotic Fluid, fetal Urine and Meconium during late Pregnancy and Delivery. Amer. J. Obstet. Gyn. 114 p. 788-795 (1972)

70. SIEGEL, I.A. : Leucine Aminopeptidase in Pregnancy. Obst. and Gynec. 14 p. 488-490 (1959)

71. SKARAMOVSKY, V., VECEREK, B., BENDOVA, M., TRNKA, V. : Fluorometric Determination of Cystine-Aminopeptidase and Oxytocinase Activity in Pregnancy. Clin. Chim. Acta. 35 p. 353-357 (1971)

72. SMALL, C.W., WATKINS, W.B. : An improved Method for Determination of human Pregnancy serum Oxytocinase Activity. Enzymology 41 p. 121-128 (1971)

73. SMALL, C.W., WATKINS, W.B. : S-benzyl-L-cysteine-p-nitroanilide. A new Substrate for the Determination of Oxytocinase with improved specificity. Biochem. Med. 9 p. 103-112 (1974)

74. STAMM, D. : Contrôle de qualité des analyses en chimie clinique. Bio-Mérieux-Simept Eds. (1975)

75. THEOBALD, G.W. : Oxytocin reassessed. Obstet.Gynecol. Surv. 23 p. 109-131 (1968)

76. TITUS, M.A., REYNOLDS, D.R., GLENDENING, M.B., PAGE, E.W. : Plasma Aminopeptidase Activity (Oxytocinase) in Pregnancy and Labor. Amer. J. Obstet. Gyn. 80 p. 1124-1128 (1960)

77. TOVEY, J.E. : Serum Oxytocinase. Clin. Biochem. 2 p. 289-310 (1969)

78. TOVEY, J.E., DAWSON, P.J.G., FELLOWE, K.P. : Evaluation of S-benzyl-L-cysteine-4-nitroanilide as a Substrate for serum Cystine-Aminopeptidase. Clin. Chem. 19 p. 756-761 (1973)

79. TUPPY, H. : The amino Acid Sequence in Oxytocin. Biochem. Biophys. Acta. 11 p. 449-450 (1953)

80. TUPPY, H., NESVADBA, H. : Ueber die Aminopeptidase-Aktivität des Schwangerenserums und ihre Beziehung zu dessen Vermögen Oxytocin zu inaktivieren. Mh. Chem. 88 p. 977-988 (1957)

81. TUPPY, H., WINTERSBERGER, E. : Reinigung und Eigenschaften des Serum. Oxytocinase. Monatsh. Chem. 91 p. 1001-1010 (1960)

82. TUPPY, H. : Biochemical Studies of Oxytocinase. In : Oxytocin. p. 315-324. Caldeyro-Barcia, R. and Heller, H., Eds. London (1961)

83. TUPPY, H., WEISBAUER, U., WINTERSBERGER, E. : Aminosäure-p-nitroanilide als Substrat für Aminopeptidase und andere proteolytische Fermente. Z. Physiol. Chem. 329 p. 278-288 (1962)

84. URFER, J. : Hormonothérapie en gynécologie. p. 19. Snocik-Ducaju et fils, Eds., Gand (1973)

85. VAN BUUL, T., VAN OUDHEUSEN, A.P.M. : A comparative Study of recent Assay of serum Cystine-Aminopeptidase in Pregnancy. Clin. Chim. Acta. 54 p. 236-238 (1974)

86. VAN DYKE, H.B., ADAMSONS, K., ENGEL, S. : Recent Progress in Hormone Research 11 p. 1-41 Pincus, G., Ed., New-York (1955)

87. VAN OUDHEUSEN, A.P.M. : Kinetic Determination of serum Oxytocinase using a new Substrate. Z. Klin. Chem. Biochem. 7 p. 345-346 (1972)

88. VORHERR, H. : Disorders of uterine Functions during Pregnancy, Labor and Puerperium. In : Pathophysiology of Gestation. Vol. 1 p. 145-268. Assali, N.S., Ed., Academic Press. Inc., New York (1972)

89. WACHSTEIN, M., MEAGHER, J.G., ORTIZ, J. : Enzymatic Histochemistry of the term human Placenta. Amer. J. Obstet. Gyn. 87 p. 13-26 (1963)

90. WATKINS, W.B., SMALL, C.W. : Immunologic inactivation of human pregnancy serum Oxytocinase Activity. Amer. J. Obstet. Gyn. 113 p. 973-978 (1972)

91. WATSON, D., GIBBARD, S. : Automated Determination of serum Aminopeptidase. Clin. Biochem. 6 p. 60-61 (1973)

92. WERLE, E., KALVELAGE, A. : Ueber die Vasopressin-inaktivierende Kraft des Blutes von Schwangeren und die Natur des inaktivierenden Prinzips. Biochem. Z. 308 p. 405-412 (1941)

93. WERLE, E., EFFKEMANN, G. : Ueber die Oxytocin-abbauende Fähigkeit des Schwangerenblutes. Arch. Gynäk. 171 p. 286-290 (1941)

94. WINTERSBERGER, E., TUPPY, H., STOKLASKA, E. : Ueber ein kompetitives Substrat der Oxytocinase. Monatsh. Chem. 91 p. 577-581 (1966)

95. WIQVIST, N., WIQVIST, I., FIELITZ, C., CALDEYRO-BARCIA, R. : Effects of oxytocin on the uterine response to electrical stimulation. Acta. Endocrinol. 41 p. 161-169 (1962)

96. YMAN, L. : Studies on human serum Aminopeptidase. Acta. Pharm. Suedicca. 7 p. 75-86 (1970)